

12. 05. 2004

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 15 JUN 2004

WIPO

PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

 **Aktenzeichen:**

103 23 923.5

Anmeldetag:

22. Mai 2003

Anmelder/Inhaber:

Carl Zeiss Jena GmbH,
07745 Jena/DE

Bezeichnung:

Einstellbares Pinhole, insbesondere für ein Laser-
Scanning-Mikroskop

IPC:

G 02 B 26/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 29. April 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
im Auftrag

Agurks

Einstellbares Pinhole, insbesondere für ein Laser-Scanning-Mikroskop

Die geometrischen Parameter des Pinholes sind entscheidend für die Leistungsfähigkeit eines Laserscanmikroskopes. Je kleiner und genauer sich das Pinhole einstellen läßt, um so höhere Auflösungen des Laserscanmikroskopes sind erzielbar und um so kleinere Abmessungen der Mikroskopoptik sind möglich. Es bringt Vorteile, Pinholeöffnungen ab $3\mu\text{m}$ Größe einstellen zu können. Reproduzierbarkeiten von $0,3\mu\text{m}$ in der Einstellung der Pinholeöffnung und -lage sind dann gefordert. Noch kleinere Pinholeöffnungen bewirken zu große Intensitätsverluste durch Beugung des hindurchtretenden Lichtes an den Pinholekanten. Die Pinholeöffnung, die vorwiegend vor dem Photoempfänger angeordnet ist, muß nicht kreisförmig sein, sondern kann ebenso auch eine quadratische Form aufweisen.

Für einstellbare Pinholes in Laserscanmikroskopen werden Elemente verwendet, die bevorzugt zur Erzeugung quadratischer Öffnungen, verstellbare gerade körperliche Kanten aufweisen. Damit diese Kanten möglichst scharf sind und hierdurch die Öffnung eine geringe Ausdehnung in Richtung des Lichtflusses aufweist, sind diese Elemente an den Kanten der Öffnung entweder angefast oder die Elemente sind dünne Folien. Der Stand der Fertigungstechnik ermöglicht Kanten, die Pinholes mit Ausdehnungen in Richtung des Lichtflusses von weit über $10\mu\text{m}$ zur Folge haben. Bei solchen Pinholes besteht jedoch die Gefahr der Vignettierung des Lichtes, wenn Öffnungen von kleiner als $10\mu\text{m}$ Größe eingestellt werden sollen.

So wird in der DE 202 05 079 U1 eine variable Lochblende für ein konfokales Scanmikroskop beschrieben, die aus zwei diametral beweglichen Blendenbacken mit Einkerbungen besteht. Solche Einkerbungen sind nur begrenzt scharfkantig herstellbar, so daß solch ein Pinhole eine Ausdehnung in Richtung des Lichtflusses von ca. $100\mu\text{m}$ aufweist. Die Nachteile dieser Lösung sind die Gefahr der Vignettierung des Lichtes und die unvermeidlichen Rundungen der Ecken in den Einkerbungen. Beides führt dazu, daß quadratförmige Öffnungen von unter $10\mu\text{m}$ Größe nicht einstellbar sind. Ausreichend kleine Schrägstellungen des Pinholes, von z. B. weniger als $0,1^\circ$, lassen sich nur mit relativ hohem technischen Aufwand erzielen.

Das Ziel der Erfindung besteht darin, ein einstellbares Pinhole zu realisieren, daß Öffnungen ab $3\mu\text{m}$ Größe in einem Feld von $1 \times 1 \text{ mm}^2$ mit $0,3\mu\text{m}$ Toleranz ermöglicht. Hierbei ist es wichtig, die körperliche Ausdehnung der Öffnung in Richtung des Lichtflusses ausreichend klein zu halten, z. B. kleiner als $10\mu\text{m}$, um Vignettierungen des die Öffnung passierenden Lichtes zu vermeiden.

Der Lösungsvorschlag besteht darin, für das Pinhole im Laserscanmikroskop zwei spiegelbildlich und zueinander verschieblich angeordnete Siliciumbliquen mit je einem quadratischen Ätzfenster anzuwenden.

Ein Vorteil der Lösung besteht darin, daß Silicium eine kubische Kristallstruktur aufweist und somit beim photolithographischen Ätzen quadratische Öffnungen entstehen, deren Kanten atomar scharfkantig sind. Außerdem weisen die Flanken der Öffnung einen spitzwinkligen Ätzwinkel von $54,7^\circ$ auf, so daß durch die spiegelbildliche Anordnung von zwei Siliciumbliquen Pinholes mit beliebig kleiner Öffnung und beliebig kleiner Ausdehnung in Richtung des Lichtflusses gebildet werden können.

Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß mit Silicium als Blendenmaterial in einem gewissen visuellen Spektralbereich von etwa 500nm optisch weiche Blenden entstehen, weil Silicium in diesem Spektralbereich mit zunehmender Wellenlänge eine zunehmende Lichtdurchlässigkeit aufweist. Hierdurch werden in diesem begrenzten Wellenlängenbereich um 500nm Beugungserscheinungen an der Blende vermieden oder gemindert. Das führt zur Verminderung von Lichtverlusten im Laserscanmikroskop durch Beugung und zu größeren Lichtintensitäten auf dem Photoempfänger bei kleinen Pinholeöffnungen und somit zu einer höheren Empfindlichkeit des Laserscanmikroskopes in diesem Spektralbereich des Lichtes. Der Nachteil von Silicium, nämlich seine zunehmende Lichtdurchlässigkeit ab dem visuellen Rotbereich, kann durch eine Reflektions-oder Absorptionsbeschichtung seiner Oberfläche behoben werden.

Bild 1: Pinhole aus 2 Siliciumbliquen

In Siliciumbliquen, mit den äußeren Abmessungen von ca. $7 \times 5 \times 0,5 \text{ mm}^3$, sind photolithographisch Fenster von $1 \times 1 \text{ mm}^2$ Größe geätzt. Die Siliciumbliquen werden paarweise so zueinander angeordnet, daß die geätzten Fenster spiegelbildlich zueinander liegen. Die Befestigung der Siliciumbliquen auf der Pinholemechanik erfolgt durch Kleben. Eine Distanzplatte dient der Einhaltung des erforderlichen Abstandes zwischen oberer Blende und Pinholemechanik. Eine Abstandsfolie, die zwischen den Blenden angeordnet ist, bewirkt eine Pinholehöhe von $10 \mu\text{m}$. Durch eine antiparallele Bewegung der beiden Elemente der Pinholemechanik lassen sich Pinholegrößen zwischen 0 und 1mm einstellen.

Die Bewegungsrichtung der Pinholemechanik ist hierbei antiparallel zu den Diagonalen d der Ätzfenster in den Siliciumplatten.

Eine Schutzbeschichtung der Si-Blenden soll verhindern, das Licht die Blende außerhalb der Öffnung passiert, weil Silicium für langwelliges Licht ab etwa 500nm Wellenlänge zunehmend transparent wird. Hierzu können die Siliciumblenden mit einer etwa 100nm dicken Chrom, Gold, Aluminium oder Silberschicht bedampft werden. Alle diese Schichten haben aber den Nachteil einer hohen Reflektivität, so daß durch Reflexion störendes Streulicht im Laserscanmikroskop entsteht.

Besser geeignet sind schwarze lichtabsorbierende Schutzschichten, wie sie z. B. durch spezielle Bedampfung aufgetragen werden können.

Wieder Erwarten kann auch ohne Beschichtung gearbeitet werden, vorteilhaft im Wellenlängenbereich bis 600nm.

Zur Justierung werden unter einem Mikroskop die Blenden bei kleiner Öffnung, von z. B. 10µm Größe, mit Hilfe von Manipulatoren justiert. Weil wegen der geringen Pinholehöhe nur eine Tiefenschärfe von 10µm vom Mikroskop gefordert zu werden braucht, können hochauflösende Mikroskope mit einer Apertur von z. B. $A = 0,8$ Anwendung finden. Bei herkömmlichen Pinholes ist das nicht möglich, weil das Mikroskop wegen der Pinholehöhe von 100µm dann eine entsprechend hohe Tiefenschärfe und kleine Apertur von z. B. $A = 0,1$ aufweisen muß.

Bild 2: Justierung der Siliciumblenden durch integrierte Motorantriebe

Elemente 1 und 2 sind in X-Richtung antiparallel verschiebbar und tragen die beiden Siliciumblenden, wobei mindestens eine Blende auf einem weiteren Element 3 gelagert ist, das senkrecht zur Verschieberichtung der Elemente 1 und 2 verschiebbar ist.

Element 3 ist an zwei Festkörpergelenken befestigt, die eine hohe Steifigkeit in Verschieberichtung der Elemente 1 und 2 und eine hohe Gelenkigkeit in Verschieberichtung des Elementes 3 aufweisen.

Die Verschiebung des Elementes 3 in Y-Richtung erfolgt mittels zweier von einem Motor angetriebenen Spindeln, wobei der Motor drehgesichert und verschieblich am Element 2 angeordnet ist. Die zwei Spindeln, die in je eine auf Element 2 und 3 befestigte Mutter eingreifen, weisen vorteilhaft unterschiedliche Steigungen auf, beispielsweise kann eine Differenzsteigung von 50µm vorliegen.

Die Siliciumblenden werden in vorjustierter Lage auf die Elemente 1 und 3 der Pinholemechanik aufgeklebt (**Bild 2**). Durch den in y-Richtung zwischen den Elementen 1

und 3 wirkenden Motorantrieb mit Differenzgewindespindeln und durch die Gelenkanordnung (z. B. Festkörperparallelfedergelenke) ist die Justierung und jederzeit auch die Nachjustierung der Siliciumblenden im Laserscanmikroskop mit einer Auflösung von z. B. $0,1\mu\text{m}$ möglich. Die Auflösung von $0,1\mu\text{m}$ ergibt sich aus der Differenzsteigung der Gewindespindeln von z. B. $50\mu\text{m}$, aus dem Mikroschrittbetrieb des Schrittmotors von 16 Mikroschritten pro Vollschrift und aus 20 Vollschriften pro Motorumdrehung. Bei der Justierung werden unter mikroskopischer Beobachtung die Elemente 1 und 2 antiparallel in x-Richtung und Element 3 in y-Richtung motorisch verstellt bis ein quadratisches Pinhole von z. B. $10 \times 10\mu\text{m}^2$ Größe entsteht. Die Pinholeöffnung ist nun in dieser aber auch in einer anderen Größe quadratisch, wenn Element 1 und 2 antiparallel in X-Richtung verschoben werden. Vorteilhaft läßt sich hierdurch jederzeit das Pinhole auch im Laserscanmikroskop nachjustieren, falls dort seine mikroskopische Beobachtung ermöglicht wird. Die Elemente 1 und 2 werden zur Einstellung der Pinholegröße durch einen nicht dargestellten scherenartigen Mechanismus antiparallel in x-Richtung bewegt.

Das Pinhole kann im Laserscanmikroskop jederzeit auch ohne seine mikroskopische Beobachtung nur unter Auswertung der Signale des Photoempfänger des Laserscanmikroskopes zum Quadrat justiert werden. Hierzu werden durch einen motorgesteuerten Scanvorgang die Elemente 1, 2 und 3 so gestellt, daß bei möglichst kleiner Pinholeöffnung das auf den Photoempfänger fallende Licht eine maximale Intensität aufweist. Dann muß das Pinhole eine quadratische Form aufweisen. Hierzu wird bei schrittweise kleiner werdender Blendenöffnung (x-Trieb) die auf Element 3 befestigte Si-Blende mittels y-Trieb so gestellt, daß der Photoempfänger ein maximales Lichtsignal empfängt. Dieser Scanvorgang abwechselnd mittels der x- und y-Triebe wird solange wiederholt, bis das maximale Lichtsignal des Photoempfängers eine vorbestimmte minimale Größe erreicht hat, das einer Pinholegröße von z. B. $10\mu\text{m}$ entspricht. Nach diesem automatischen Justierprozeß weist die Pinholeöffnung in jeder Größe zwangsläufig eine quadratische Form auf.

Bild 3: Pinholefläche in Abhängigkeit von der Pinholedejustierung y_{just}

Wie aus der Kurvenschar in **Bild 3a** zu erkennen ist, ergibt sich auf Grund der quadratischen Abhängigkeit der Pinholefläche von der Pinholedejustierung bei $y_{\text{just}} = 0$ eine sehr geringe Empfindlichkeit des Photoempfängers bei der Verstellung in y-Richtung und bei einer Dejustierung von $y_{\text{just}} = b$ eine maximale Empfindlichkeit. Vorteilhaft kann deshalb die Flankenmethode Anwendung finden, bei der beim Scannen in y-Richtung an den beiden

symmetrischen Flanken je ein Meßpunkt bei hoher Empfindlichkeit bestimmt und durch Einstellung auf den Mittelwert zwischen beiden Flanken die quadratische Pinholeform gewonnen wird. Diese Justierung wird bei einer relativ großen Pinholeöffnung von z. B. 100µm begonnen und bei einer möglichst kleinen Pinholegröße von z. B. 10µm beendet. Das Ergebnis ist zwangsläufig die quadratische Pinholeöffnung bei jeder Pinholegröße. In Bild 3b sind Beispielwerte angegeben,

Patentansprüche

1.

Pinhole, insbesondere für ein Laser-Scanning-Mikroskop, bestehend aus Siliziumblenden mit jeweils rechtwinkligen spiegelverkehrten Öffnungen.

2.

Pinhole nach Anspruch 1, wobei die Siliziumblenden zueinander in einer ersten Richtung verschieblich sind.

3.

Pinhole nach Anspruch 2, wobei mindestens eine Siliziumblende senkrecht zur ersten Richtung in eine zweite Richtung zur Einstellung einer exakten Quadratform verschiebbar ist.

4.

Pinhole nach einem der Ansprüche 1-3, wobei die Blenden an Festkörpergelenken befestigt sind, die in der ersten Richtung steif und in der zweiten Richtung gelenkig ausgebildet sind.

5.

Verfahren zur Justierung eines Pinholes nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei eine Quadratform eingestellt wird, indem bei der Justierung mittels einer durch das Pinhole gehende Lichtmenge das Signal eines Photoempfängers maximiert wird.

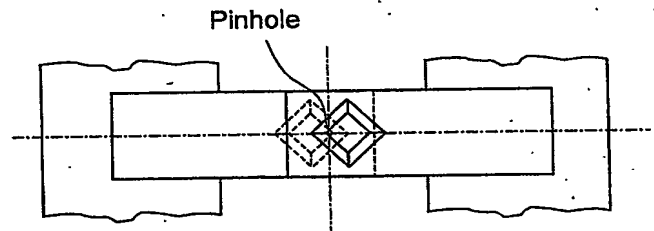
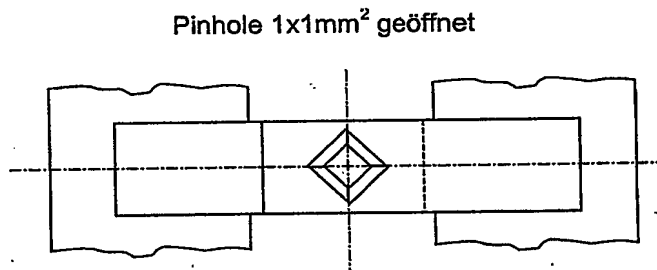
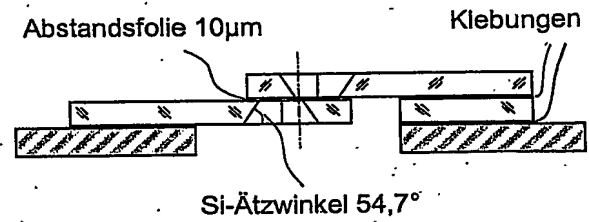
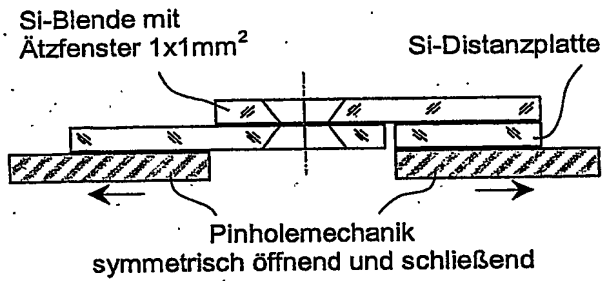
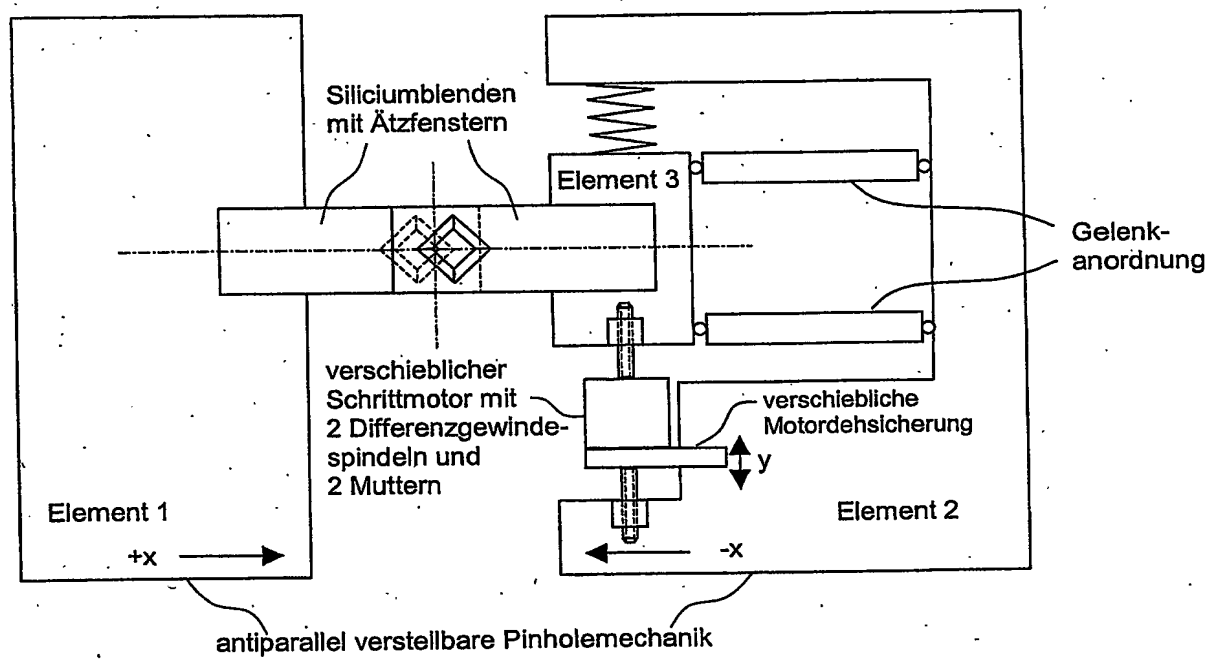
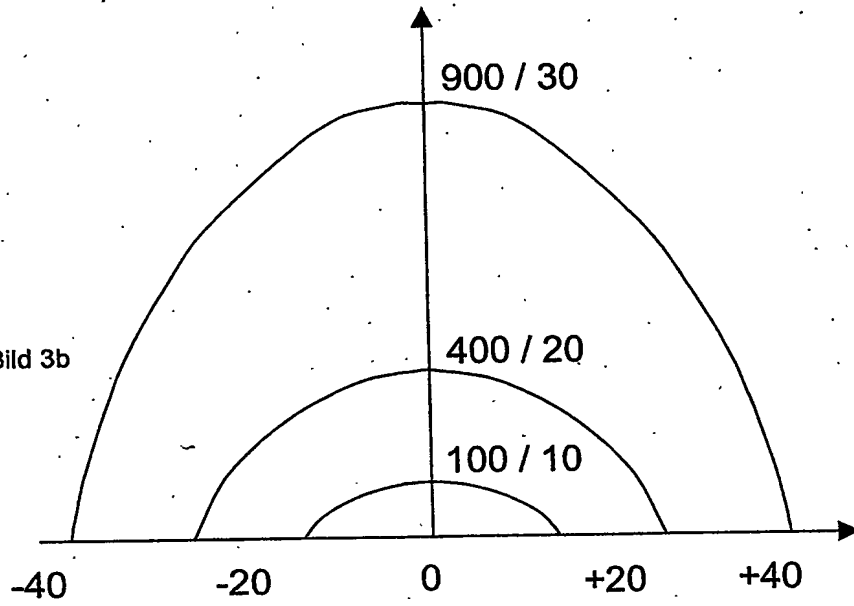
Pinhole $3 \times 3 \mu\text{m}^2$ geöffnet

Bild 1: Pinhole aus 2 Siliciumblenden

2 / 3

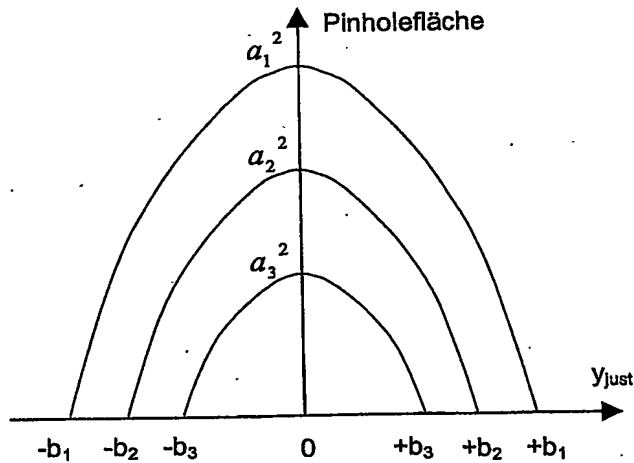
Bild2:



Pinholefläche in μm^2 / quadratische Pinholegröße in μm Dejustierung des Pinholequadrates
zum Rechteck in μm

Pinholefläche

Bild 3a:


 $a_1 = 100\mu\text{m}$
 $a_2 = 30\mu\text{m}$
 $a_3 = 10\mu\text{m}$